

THESIS

MUNICH

1966

DAVE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
350 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

**Zum Nachweis spezifischer biologischer
Wirksamkeit von Blutserum
tumorresistenter Tiere**

Wolfgang Peter Rothdach

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. W. Büngeler

**Zum Nachweis spezifischer biologischer
Wirksamkeit von Blutserum
tumorresistenter Tiere**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wolfgang Peter Rothdach
aus München

München 1966

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. H. WRBA
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. BÜNGELER
Dekan:	Prof. Dr. R. ZENKER

Tag der mündlichen Prüfung: 5.4.1966

M E I N E R M U T T E R



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	7
HAUPTTEIL	
1) Material	9
2) Methodik	
a) Hauptuntersuchung:	
Gewebekultur	9
Impfung der Tiere	11
Entbluten der Tiere	11
Zusammensetzung der Nährmedien	11
Entnahme der soliden Tumoren	11
Schneiden der Tumorexplantate	12
Inkubation	14
Vorbereitung zur Messung	15
Messung	15
b) Nebenuntersuchungen (Elektrophorese und quantitative Bestimmung der Serumproteasen)	15
3) Übersicht über die Versuchsergebnisse (Tabelle)	17
4) Aufführung der einzelnen Versuche	18
5) Ergebnisse und Besprechung	34
ZUSAMMENFASSUNG	38
LITERATURVERZEICHNIS	40
LEBENS LAUF	43
ZEICHNUNGEN:	
Schema des Versuchsganges der Hauptuntersuchung	10
Zeichnung zu den Themen "Beschaffenheit der Tumoren" und "Schneiden der Explantate"	14
Diagramm zur Frage der Beziehung zwischen Vitalität des Explantats und dessen Anfärbbarkeit mit Phenolrot	24

Unter Tumorresistenz versteht man die Erscheinung des Ausbleibens von Geschwulstwachstum nach Transplantation. Ob es sich bei diesem Phänomen um eine Resistenz im echten Sinne (definiert als angeborene Widerstandskraft) oder um eine Immunität handelt (definiert als erworbene Widerstandskraft, deren Substrat gewöhnlich serologischer Natur ist), ist noch ungeklärt (1, 2). Groß angelegte Versuche zur Genetik der Resistenz stehen noch aus. Grundsätzlich gilt immer noch die von EHRLICH vertretene Meinung, daß zwischen Wirtstier und Tumor eine Wechselwirkung insoferne bestehe, als das Wachstum einer Impfgeschwulst "ein Produkt aus Tierresistenz und Tumorigenität" sei (3).

Es ist bei Experimenten auf diesem Gebiet schwierig, aber notwendig, diese beiden Faktoren konstant zu halten. Es ist selbstverständlich, daß sich die Virulenz einer Impfgeschwulst durch chemische, physikalische oder biologische Einwirkungen ändern kann. Es treten aber spontane Änderungen der Virulenz auch gelegentlich bei streng konstant gehaltenen Versuchsbedingungen (in Bezug auf Tierhaltung, Impfmodus, Zeitpunkt der Überimpfung) auf, ohne daß dafür im Einzelfall irgendeine plausible Erklärung gefunden werden kann. Grundsätzlich scheinen solche Änderungen durch Selektionsmechanismen ("Filter" im Sinne von LETTRE (4)) bedingt zu sein. Ein Impftumor stellt ja eine "heterogene Mischung von Einzelzellen mit unterschiedlichen Eigenschaften" dar (5). Trotzdem kann man einer bestimmten Geschwulstlinie eine gewisse Individualität, die sich in charakteristischen morphologischen und biologischen Kennzeichen äußert, nicht absprechen. So ist zum Beispiel für eine gegebene Tierrasse und eine bestimmte Tumورlinie die Zahl der resistenten Tiere über lange Zeiträume konstant.

Eine besondere Schwierigkeit bei Experimenten mit Impftumoren besteht darin, von Versuchsergebnissen mit einer Geschwulstlinie zu allgemeingültigen Aussagen zu kommen. Denn erstens ist eine Impfgeschwulst nicht mit menschlichen oder tierischen Spontantumoren zu vergleichen, zweitens sind nicht nur die Eigenschaften der einzelnen Tumورlinien untereinander sehr verschieden, sondern sogar die der in den verschiedenen Instituten gehaltenen Linien gleichen Namens. So täuscht z.B. der Name "Ehrlich'scher Äszitestumor" eine Einheitlichkeit vor, die nicht vorhanden ist. Es sei hier nur vermerkt, daß die Chromosomensätze der Zellen dieser Linie in Deutschland vorwiegend diploid, in den USA dagegen vorwiegend tetraploid sind. Im Kapitel "Material"

in dieser Arbeit sind die genauen kennzeichnenden Eigenschaften des hier verwendeten Geschwulststammes "W" aufgezählt, schon um gegebenenfalls eine Nachprüfung der hier gewonnenen Ergebnisse möglich zu machen. Auch die Forderung WRBA's, man "dürfe mit einem Geschwulststamm erst dann experimentieren, wenn die Geschwulst über mindestens 10 Passagen einheitlich gewachsen ist" (5), ist bei unserem "W" erfüllt.

Der Ausgangspunkt vorliegender Arbeit bestand in einer Reihe von Versuchen, welche das Ziel hatten, Tumorresistenz mittels Parabiose zu übertragen. Mit gewissen Variationen, deren Einzelheiten bei den betreffenden Autoren (6, 7, 8, 9, 10) nachgelesen werden können, wurde grundsätzlich ein resistentes mit einem nicht resistenten Tier in Parabiose vereinigt, um die Wirkung des resistenten auf das nicht resistente Tier zu beobachten, z. B. im Hinblick auf die Überlebenszeit und / oder das Wachstum von induzierten Tumoren. Den Versuchen lag die Arbeitshypothese zugrunde, daß das Substrat der Resistenz ein humoraler Faktor sei, der durch die Kreislaufkommunikation beider Tiere übertragbar sein müßte. Die Ergebnisse der einzelnen Autoren sind z. T. widerspruchsvoll. An unserem Institut gelang es bis jetzt nicht, eine solche Resistenzübertragung in einem signifikanten Ausmaße nachzuweisen (9, 10).

In dieser Arbeit wurde nun die Parabiose-Methodik mit ihren zahlreichen Inponderabilien vermieden. Es wurde versucht zu klären, ob Blutserum von Tieren, welche Tumortransplantationen überstanden hatten, also damit als tumorresistent bezeichnet werden können, sich in biologischen Funktionen vom Serum normaler Tiere unterscheidet, oder anders ausgedrückt, ob das resistente Tier einen nachweisbaren, im Kreislauf transportierbaren, nicht zellgebundenen Faktor produziert, der den Stoffwechsel von Impfgeschwülsten beeinflusst. Dazu wurde die Explantationstechnik verwendet, wobei im vergleichenden Ansatz als Mediumzusatz Blutserum von normalen und tumorresistenten Versuchstieren an Tumorexplantaten erprobt wurde.

Wir wählten dazu die "Rollerkultur". Um quantitativ verwertbare Ergebnisse zu gewinnen, erhielten die Kulturen Zusätze von radioaktivem Phosphat. Der Umsatz dieser Indikatorsubstanz lieferte den verwertbaren Maßstab für die Stoffwechselwirksamkeit der verwendeten Mediumzusätze.

Als entscheidende Modifikation erwies sich für den Nachweis einer solchen biologischen Wirkung die Provokation der Abwehrkraft. Es wurde dabei so verfahren, daß sowohl als resistent erkannte Tiere als auch unbehandelte Normaltiere gleichen Stammes und Geschlechts zu einem bestimmten Zeitpunkt eine Transplantation von Tumormaterial erfuhren. Der eigentliche Versuchsansatz wurde 2 bis 16 Tage nach dieser Provokationsbehandlung vorgenommen.

MATERIAL

Wir verwendeten mit Wasser und Preßfutter im Überschuß ernährte Ratten vom Sprague-Dawley-Stamm. Mit Ausnahme des Versuchs III wurden in einem Versuch nur Tiere gleichen Geschlechts verwendet. Das Gewicht betrug zwischen 100 und 600 gr. (Genaue Zahlen siehe bei den einzelnen Versuchen!) Größere Gewichtsunterschiede der Vergleichstiere wurden in der Regel vermieden. Die Narkose wurde mit Äther vorgenommen. Ohne Zweifel hat dieser eine toxische Wirkung, wenn er durch die Anreicherung im Serum in die Nährmedien der Gewebekultur gelangt. (Siehe dazu Versuch XV Ansätze 1 und 2!) Die Ausbeute an Blut bei durch Genickschlag getöteten Tieren war jedoch zu gering, um die Äthernarkose ersetzen zu können. Der verwendete Tumorstamm "W" ist ein in Aszitesform übergeführtes solides WALKER-Carcinom. Nachdem Geschwulstlinien gleichen Namens in ihrer Reaktionsweise sehr unterschiedlich sein können, seien einige morphologische und biologische Eigenschaften dieser Linie genannt:

- 1) Zellzahl 34 000 im mm³ Aszites
- 2) Makroskopisches Aussehen: hämorrhagisch
- 3) Zahlenverhältnis Leukozyten zu Malignomzellen 7 : 34
- 4) %-Satz der resistenten Tiere bei
 - a) subkutaner Impfung : 28,3 %
 - b) intraperitonealer Impfung : 8,4 %
- 5) Überlebenszeit der Aszitestumorträger
5 - 16 Tage, 8 Tage im Mittel.

METHODIK (1)

Gewebekultur

Wir ließen im vergleichende 1. Ansatz auf explantierte Tumoren 3 Arten von Seren als Mediumzusatz einwirken

- a) Serum resistenter Tiere, die einige Tage vor dem Versuchsansatz einer provozierenden intraperitonealen Impfung mit dem Tumoraszites "W" unterzogen worden waren:

Sym b o l R

- b) Serum bis dahin unvorbehandelter Tiere, die mit den Resistenten zusammen einer ebenfalls intraperitonealen Impfung zur gleichen Zeit und mit gleichem

Tumormaterial unterzogen worden
waren:

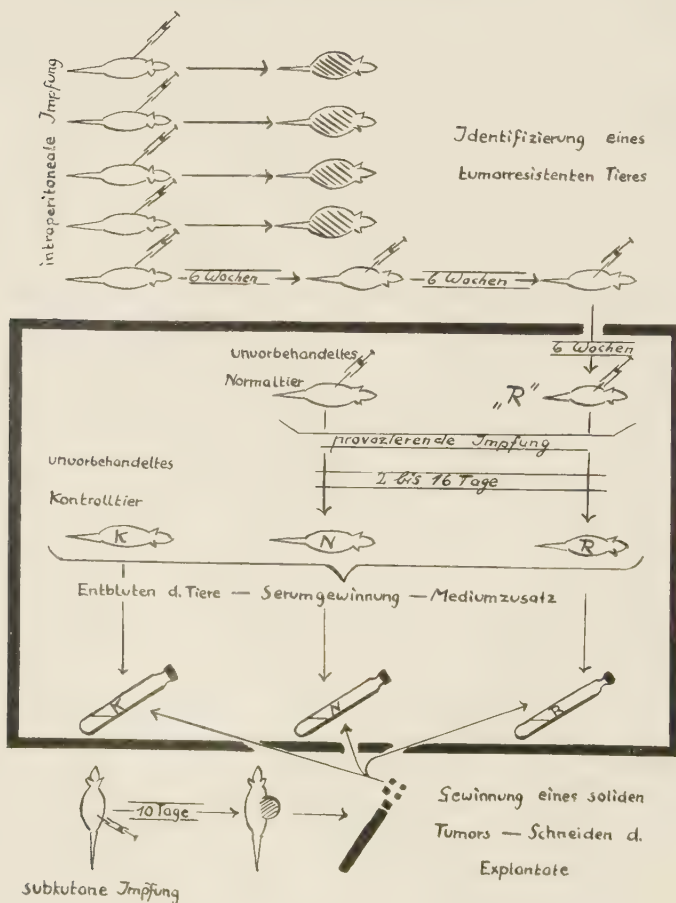
Symbol N

c) Serum gänzlich unvorbehandelter Kontrolltiere:

Symbol K

Die Tumorexplantate wurden aus soliden, durch subkutane Impfung mit dem oben genannten "W"-Aszites in die Bauchhaut induzierten Geschwülsten geschnitten.

Schema des Versuchsganges



Einzelheiten der Methodik

1) Die Impfung der Ratten

Der Spender des Tumoraszites wurde 4 bis 5 Tage nach Impfung durch Genickschlag getötet. Unter sterilen Kautelen wurde der Aszites abpunktiert und sofort weiterverimpft. Die Menge des verimpften Tumoraszites betrug grundsätzlich 0,5 ml pro Tier.

2) Das Entbluten der Tiere

Nach Äthernarkose wurden die Tiere in Rückenlage fixiert, das Fell mit 70 % Alkohol oder mit Jodtinktur desinfiziert. Nach Freilegung des Mediastinums wurde zunächst der linke, sodann durch das Kammerseptum hindurch der rechte Herzventrikel punktiert. Die Ausbeute an Blut betrug je nach Größe des Tiers 5 bis 15 ml. Anschließend sofortiges Einfüllen in Zentrifugengläschen und Kühlung von einer Stunde Dauer. Danach gewannen wir auf die übliche Weise Serum durch Zentrifugieren bei 2500 Umdrehungen p.M.

3) Zusammensetzung der Nährmedien für die Explantation

Die Medien enthielten eine Salzlösung nach HANKS, ferner die Seren der Versuchstiere sowie einen Zusatz von Penicillin G. Der Anteil der HANKS-Lösung war bei sämtlichen Versuchen 3,0 ml pro Ansatz, der Penicillinzusatz betrug stets 2250 I.E. pro Ansatz. Die Serummenge war in den Versuchen I bis X konstant 1,5 ml, also 33 % des Mediums. In den Versuchen XI bis XVII schwankte der Serumzusatz zwischen 0,5 und 2,5 ml pro Ansatzröhrchen, war jedoch in den zu vergleichenden Ansätzen stets gleich groß. Genaue Zahlen finden sich bei der Aufführung der betr. Versuche. Auf die Verwendung des sonst in der Gewebezüchtung verwendeten Embryonalextraktes wurde grundsätzlich verzichtet.

4) Die Entnahme des soliden Tumors

Nach Fixierung des durch Genickschlag getöteten Tiers in geeigneter Lage Desinfektion des Fells und Ausschneiden eines schmalen Fellstreifens kreisförmig um den Tumor herum. Dann Abzug des den Tumor noch bedeckenden zentralen Fell-Restes, anschließend mit neuem Besteck Exzision der soliden Geschwulst, die in eine sterile Petrischale gelegt und umgehend weiterverarbeitet wurde.

5) Das Schneiden der Explantate

Wohl die größte Schwierigkeit quantitativer Versuche mit Tumor-Explantaten ergibt sich aus der extremen Inhomogenität eines soliden Tumors, und zwar sowohl in Bezug auf die Zellzahl pro Raumeinheit als auch auf die Vitalität der einzelnen Tumorteilchen. Es wurde versucht, diesen Schwierigkeiten einerseits durch Verwendung einer größeren Anzahl von Explantaten pro Ansatz, andererseits durch Auswahl von Tumorteilchen gleicher makroskopischer Beschaffenheit für einen Versuch zu begegnen. Der solide Tumor besteht aus 4 voneinander mehr oder weniger deutlich abgrenzbaren Anteilen. Von außen nach innen folgt auf eine elastische, schwer schneidbare Kapsel ein verschieden dicker Saum von blaß bis rosa glasig aussehendem vitalem Gewebe fester Konsistenz, das sich am besten für Explantationen eignet. Die aus der Kapsel hier unmittelbar einwachsenden Gefäße bedingen eine gute Versorgung mit Nährstoffen und damit auch gute Vitalität. Weiter zentral folgt eine Übergangszone mit geringerer Konsistenz, welche "grieselige" Partien, d. h. mit punktförmigen Nekrosen durchsetztes Gewebe mit beginnender Autolyse enthält. Explantate aus dieser Übergangszone haben in physiologischen Salzlösungen eine große Neigung zur Quellung. Ferner macht man die Beobachtung, daß sie sich besonders leicht mit dem in der HANKS-Lösung enthaltenen Phenolrot anfärben, allerdings erst nach stundenlanger Einwirkung bei Brutschranktemperatur. Die Aktivität solcher Explantate ist nach einer Inkubation mit aktivem Phosphat wesentlich niedriger als die der nicht anfärbbaren Explantate aus der kapsel-nahen Partie des Tumors. (Siehe Versuch IX!) Leider ist diese Reaktion infolge ihrer Trägheit als Vitalitäts-Indikator beim Schneiden der Explantate nicht verwendbar. Das Phenolrot hat hier offenbar die Eigenschaft eines Supravital-Farbstoffes. Explantate aus dieser Übergangszone wurden nur dann verwendet, wenn kein oder nicht genügend anderes Material zur Verfügung stand. Auf die Übergangszone folgt weiter zentral eine käsige oder hämorrhagische Nekrose, die selbstverständlich für eine Explantation unbrauchbar ist.

Methode I zur Gewinnung der Explantate

(verwendet in den Versuchen I bis IX)

Sämtliche Explantate wurden vorgeschritten und wahllos in eine mit HANKS-Lösung gefüllte Petrischale gelegt. Sodann wurde behutsam umgerührt, um die Anteile der einzelnen Ursprungsteilchen gut zu mischen. Unter Kontrolle der Analysenwaage wurden nun die einzelnen Explantate wiederum wahllos aus der Petrischale genommen und auf nummerierte und mit 0,5 ml HANKS-

Lösung gefüllte Glaszylinderchen von etwa 1 cm^3 Rauminhalt verteilt, welche zum Schutze der Sterilität in kleinen Petrischalen untergebracht waren. Alle Ansätze eines Versuches, d.h. alle Zylinderchen mußten eine gleiche Anzahl von Explantaten gleichen Gesamtgewichts enthalten. Es ist bei dieser Methode statistisch wahrscheinlich, daß die einzelnen Tumorphantien in allen Ansätzen etwa gleichmäßig vertreten sind. Das Verfahren liefert gute Ergebnisse bei Tumoren mit ausgedehnter Zentralnekrose und schmalem Saum von Tumorgewebe guter Vitalität, aus dem man einen Keil heraus-schneiden soll, welcher alle Ansätze bestreitet (s. Abb. 1 a).

Methode II zur Gewinnung der Explantate (verwendet in den Versuchen X bis XVII)

Die brauchbaren Teile des Tumors wurden zunächst in kleine Streifchen von etwa 10 bis 30 mg Gewicht geschnitten und vorübergehend in einer HANKS-gefüllten Petrischale deponiert. Dann wurden die einzelnen Streifchen nach folgendem Verfahren geschnitten: An der Schmalseite wurde jeweils ein Scheibchen abgeschnitten, dieses halbiert und jede der beiden Hälften auf einen Ansatz gegeben. Nach einigen solcher Gänge wurde das Gewicht mit der Analysenwaage kontrolliert. Eventuelle Diskrepanzen zwischen den beiden vergleichbaren Ansätzen wurden anschließend durch leicht asymmetrische "Halbierung" eines Scheibchens ausgeglichen. Dabei wurde darauf Wert gelegt, daß ein solcher Gewichtsausgleich mit Teilen des gleichen Streifchens erfolgte. Die in der Abb. 2 gezeigte Idealmethode war insbesondere, was die wechselseitige Verteilung von "links" und "rechts" angeht, nicht immer realisierbar, wurde aber angestrebt. Vergleichbar sind bei dieser Methode selbstredend immer nur die beiden entsprechenden Parallelansätze, bei welchen eine größtmögliche Wahrscheinlichkeit besteht, daß sie gleichwertig in Bezug auf Vitalität und Zellzahl sind.

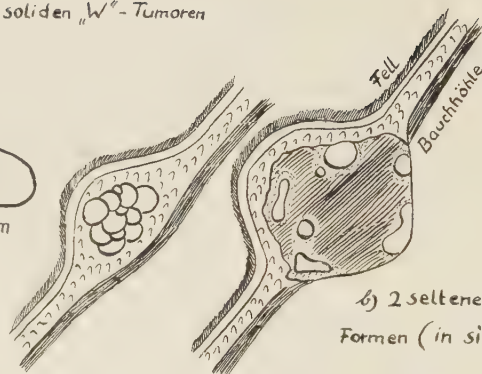
6) Inkubation

Der Inhalt der einzelnen Zylinderchen wurde nun in spezielle mit HANKS-Lösung und Penicillin gefüllte Röhrchen von etwa 20 cm^3 Rauminhalt um pipettiert und dann das jeweilige Serum zugesetzt. Die Röhrchen wurden sodann steril mit eingeschliffenen Glasstöpseln verschlossen und im sogenannten "Roller-Inkubator", einem besonders ausgestatteten Brutschrank, bei 37°C inkubiert. Dieser Inkubator enthält eine mit etwa 70 Umdrehungen / Minute um eine etwa 20 Grad zur Horizontalen geneigte Achse rotierende Trommel, in welche die Röhrchen parallel und konzentrisch zur

Abb 1) Makroskopie d. soliden „W“-Tumoren



a) häufigste Form
(präpariert)



b) 2 seltenere
Formen (in situ)



vitale



grieselige

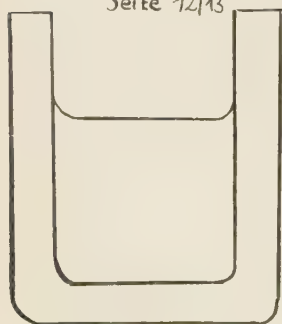


nekrotische

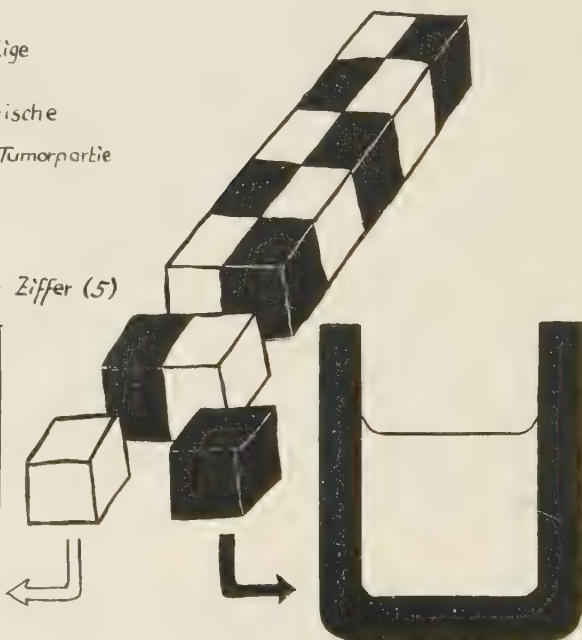
Tumorteil

Abb 2) Erklärung zu Ziffer (5)

Seite 12/13



Ansatz 1



Ansatz 2

Drehachse eingeführt werden. Nach dieser Inkubation wechselnder Dauer bekamen alle Röhrchen einen genau abgemessenen Zusatz von aktivem Phosphat und wurden anschließend weiter inkubiert.

7) Vorbereitung zur Messung

Nun wurde das Medium vorsichtig abpipettiert. Um Reste von aktivem Phosphat weitgehend zu entfernen (Austausch-Diffusion), wurde folgender Arbeitsgang eingehalten:

Spülung mit anschl. Abpipettieren in

10 ml Hanks, dann

10 ml isotonischer Phosphatpufferlösung, in welcher die Explantate etwa 30 Min. liegen bleiben. Zuletzt in

2 ml Phosphatpuffer:

Zusammen mit dieser Lösung wurden nun die Explantate der einzelnen Ansätze auf einen Glasdeckel pipettiert, wo sie mit feinen Messerchen unter Vermeidung von Druck herausgefischt und auf Meßplättchen verteilt wurden. Um die Resorption der Beta-Strahlen durch Wasser zu vermindern oder jedenfalls etwas zu standardisieren, wurden die Gewebe einer mindestens 24-stündigen Trocknung bei 60°C unterzogen.

8) Anschließend erfolgte dann die Messung mit dem Geiger-Müller-Zählrohr bei einer Rohrspannung von 700 V.

Nebenuntersuchungen

a) Elektrophorese

In einer Reihe von Versuchen wurden die Rattenserumseren einer Papierelektrophorese üblicher Methode unterzogen.

b) Quantitative Bestimmung proteolytischer Serumfermente (modifiziert nach GASCHLER) Versuche X bis XIV, XVII.

Dieser Test geht von folgender Überlegung aus: Der Vorgang der Blutgerinnung findet seinen Abschluß mit der Retraktion des Blutkuchens. Die in dem dabei ausgepreßten Serum vorhandenen proteolytischen Fermente (es geht in diesem Rahmen nicht um eine genaue fermentchemische Spezifizierung einzelner Fermentarten) dauern nun das Fibringerüst an und setzen damit die in

diesem eingeschlossenen Erythrozyten bzw. deren Zersetzungsprodukte frei, und zwar in der Zeiteinheit eine ihrer Aktivität entsprechende Menge. GASCHLER (11) und DYBALLA (12) bestimmen diese freigesetzte Erythrozytenmenge mit der etwas ungenauen SAHLI'schen Hämometermethode.

Verf. modifizierte die Methode wie folgt:

Sterile Zentrifugenröhrchen wurden auf Centigramm genau abgewogen und erhielten eine Beschriftung mit dem gefundenen Gewicht. Nach der Entblutung jeweils einer Ratte wurde sofort etwa 1,5 ml Blut unter strikter Vermeidung von Schaumbildung aus der Punktionsspritze mit noch sitzender Kanüle in ein Röhrchen gegeben. Sämtliche Röhrchen eines Versuchs wurden, steril verschlossen und aufrecht stehend, etwa 24 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Anschließend Wägen, Ausrechnen des Nettofüllgewichts, Öffnen der Gläschen und vorsichtiges Ablösen des Blutkuchens von der Wand mit einem Glasstäbchen. Bei der Originalmethode wird der Blutkuchen mit dem Glasstab durchstoßen und damit wohl eine unkontrollierbare und von Ansatz zu Ansatz wechselnde Menge von Erythrozyten auch aus dem Innern des brüchigen Blutkuchens freigesetzt. Verf. legte im Gegensatz dazu darauf Wert, den Blutkuchen in toto unverletzt von der Wand abzulösen und damit nur diejenigen Erythrozyten zu bestimmen, welche an der zylindrischen Oberfläche des Blutkuchens infolge der proteolytischen Aktivität des umgebenden Serums freigesetzt wurden; die proteolytischen Vorgänge im Innern des Blutkuchens bleiben also bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode mit Absicht unberücksichtigt. Anschließend wurde mit einer Pipette die gleiche Anzahl von ml einer farblosen isotonischen Salzlösung in die Röhrchen gegeben, wie das Nettogewicht in Gramm betrug (also z. B. 1,45 ml Ringerlösung in ein Gläschen mit 1,45 gr. Nettogewicht). Mit einer Blutzuckerpipette wurde nun nach einigen Malen vorsichtigen Umkippen eine bei allen Röhrchen gleiche Menge von Erythrozytensuspension entnommen und in vorbereitete Reagenzgläser pipettiert, die je 5 ml ⁿ/10 Salzsäure enthielten. Die erhaltenen bräunlichen Lösungen wurden dann nach einer Pause von mindestens einer Stunde (zur möglichst 100%igen Umsetzung Hämoglobin in salzsaures Hämatin) mit dem Photometer gegen eine farblose oder schwächer konzentrierte Lösung von Hämatin-HCl (Nullwert) bestimmt. Verwendetes Filter: 546 m μ .

Nach diesen Überlegungen muß die Höhe der Extinktion in einem direkten Verhältnis zur proteolytischen Fermentaktivität stehen. Da die einzelnen Faktoren der Versuchsanordnung ("Zimmertemperatur", Zeit der Proteolyse, Menge der Erythrozytensuspension) von Versuch zu Versuch etwas variierten, sind nur die Werte jeweils einer Versuchsnummer vergleichbar.

ÜBERSICHT ÜBER DIE VERSUCHSERGEBNISSE

Vers. Nr.	Zahl der verwend. Tiere			Best. der Proteasen	Tage nach Impfung	Ergeb- nisse		Erklärung für negative Ver- suche
	R	K	N			% R	% N	
I	2	1	2	keine	4	159 159	40 36	„ „
II	2	1	2	keine	3	80 68	118 102	„
III	2	2	2	keine	2	88 84	77 98	„ „
IV	2	2	2	keine	4	55 132	42 48	Rl; Lungen- abszeß
V	1	2	1	keine	4	140	83	„ „
VI	1	2	1	keine	5	75	40	R.; Aszites
VII	2	2	2	keine	6	88 84	33 32	beide R.; As- zites
VIII	2	2	2	keine	4	110 112	93 88	„ „
IX	1	2	1	keine	5	131	128	N: kein Aszit.
X	2	2	2	+	4	120 122	76 64	„ „
XI	1	2	1	+	5	130	+))	„ „
XII	1	1	-	+	16	132	„	„ „
XIII	2	4	1	+	4	145 133	96	„ „
XIV	1	2	-	+	2	142 122	„	„
XV	3	3	-	keine	4	134 117	„	„ „
XVI	2	3	-	keine	4	114 136	„	„ „
XVII	1	1	-	+	5	139	„	„ „

Bemerkungen:

+) Hier liegt kein vergleichender Ansatz N/K vor, jedoch R/N = 176/100
Leeransätze zur Testung der Zuverlässigkeit der Methodik wurden in den Ver-
suchen IX, X, XI, XIII, XIV, XV und XVI durchgeführt.

Rubrik "Ergebnisse": Die %-Zahlen sind stets auf K = 100 % bezogen. Wurden
vom Serum eines Tieres mehrere Ansätze gemacht, erscheint in der Tabelle
der abgerundete Mittelwert.

Versuch I

In diesem Versuch gewannen wir aus einem Kontrolltier 2 Ansätze mit den Symbolen K_a und K_b , aus 2 resistenten Tieren je 1 Ansatz R_1 und R_2 und aus 2 erstmals mit Tumoraszites geimpften Tieren ebenfalls je einen Ansatz N_1 und N_2 . Die Impfung der Tiere R und N fand 4 Tage vor dem Versuchsansatz statt. Die Röhren wurden mit jeweils 12 Tumorexplantaten vom Gesamtgewicht 25 mg beschickt.

Inkubationszeit: 15 Stunden, dann
(nach P^{32} -Zugabe) 4 Stunden.

Ergebnisse: (5 Min. Messung)

	Aktivität	Nullwert	%	
Ka	7268	7040	101	K Mittel 6972 = 100 %
Kb	7132	6904	99	
R1	11287	11059	159	
R2	11228	11000	159	
N1	2999	2771	40	
N2	2737	2509	36	

Versuch II

Hier lieferten 1 Kontrolltier 2 Ansätze K_a und K_b , 2 Resistente je einen Ansatz R_1 und R_2 , ferner 2 erstmals geimpfte Tiere je einen Ansatz N_1 und N_2 . Die Impfung von R und N fand 3 Tage vor dem Versuchsansatz statt. Die Zahl der Explantate pro Röhren betrug 15, deren Gesamtgewicht 30 mg, die Inkubationszeit 15 Stunden, dann
(nach P^{32} -Zugabe) 5 Stunden

Ergebnisse: (5 Min. Messung)

	Aktivität	Nullwert	%	
Ka	28849	28599	90,5	K Mittel : 31584 = 100 %
Kb	34819	34569	109,5	
R1	25545	25295	80	
R2	21971	21721	68	
N1	37628	37378	118	
N2	33272	33022	102	

Versuch III

In diesem Versuch wurden 2 verschiedengeschlechtliche Ratten als Kontrollen verwendet. Das männliche Tier bestritt den Ansatz K_1 , das weibliche K_2 . Je einen Ansatz bestritten 2 resistente, gleichgeschlechtliche Tiere (R_1 und R_2) ebenso 2 erstmals geimpfte Tiere (N_1 und N_2). Die letzteren 4 Tiere wurden 2 Tage vor dem Versuchsansatz geimpft. Auf den Ansatz kommen 15 Explantate mit 30 mg Gesamtgewicht. Die Inkubationszeit betrug zunächst 15, dann 3 Stunden.

Ergebnisse: (5 Min. Messung)

	Aktivität	-Nullwert	%	
K1	14247	14005	99,5	K Mittel : 14070 = 100%
K2	14378	14136	100,5	
R1	12652	12410	88	
R2	12004	11762	83,5	
N1	11034	10792	76,5	
N2	14085	13843	98	

Versuch IV

Hier lieferten 2 Kontrolltiere 3 Ansätze, und zwar das erste die Ansätze $K1_a$ und $K1_b$, das zweite den Ansatz K_2 , 2 Resistente bestritten je einen Ansatz (R_1 und R_2), ebenso 2 erstmals Geimpfte (N_1 und N_2). Die Tiere N und R wurden 4 Tage vor dem Versuchsansatz geimpft. Auf 1 Ansatzröhrchen kamen jeweils 16 Explantate von 30 mg Gesamtgewicht. Nach einer Inkubation von 15 Stunden wurde hier ausnahmsweise das ursprüngliche Medium, so gut es ging, abpipettiert, und die Röhrchen nach Zusatz von 5 ml HANKS-Lösung mit aktivem Phosphat 2 Stunden weiterinkubiert. Die Endkonzentration an aktiver Substanz war bei der zweiten Inkubation derjenigen der übrigen Versuche gleich.

Ergebnisse (5 Min. Messung)

	Aktivität	=Nullwert	%	
K1a	7656	7402	103	
K1b	7475	7227	100	K Mittel: 7227 = 100 %
K2	7300	7052	97	
R1	4246	3998	55	+)
R2	9828	9580	132	
N1	3296	3048	42	
N2	3714	3466	48	

+) Das Tier R1 zeigte bei der Entblutung einen gut kirschgroßen, die gesamte linke Brusthöhle ausfüllenden Lungenabszeß, der das Mediastinum nach rechts verdrängte. Das Gebilde war leicht und vollständig auslösbar. Nach Spaltung der äußerst derben Kapsel quoll gelbgrüner, dickflüssiger Eiter heraus. Das Ansatzröhrchen R1 war im Gegensatz zu den ubrigen Röhrchen des Versuchs gelb verfärbt (Umschlag des Phenolrots im sauren Bereich!), was im Hinblick auf die niedere Aktivität der Explantate R1 nur auf eine Infizierung des Ansatzes zurückgeführt werden kann, deren Ursache mit großer Wahrscheinlichkeit das bakteriämische Serum des Tieres R1 war.

Versuch V

2 Kontrolltiere lieferten hier je einen Ansatz:

1 Tier von 225 gr Gewicht den Ansatz K1,
eines von 208 gr den Ansatz K2.

Die Serumausbeute eines 327 gr schweren resistenten Tieres reichte für 3 Ansätze: R_a, R_b und R_c. Ein 325 gr schweres, erstmals geimpftes Tier bestritt die Ansätze N_a und N_b. Die beiden Tiere N und R wurden 4 Tage vor dem Versuchsansatz geimpft. Ein Ansatz enthielt 16 Tumorexplantate von insgesamt 30 mg Gewicht.

Inkubationszeit 14 Stunden, dann 3,5 Stunden.

Im Gegensatz zu Versuch IV wurde das Medium der ersten Inkubation hier sowie in allen weiteren Versuchen vor der Zugabe des aktiven Phosphates nicht entfernt.

Ergebnisse: (5 Min. Messung)

	Aktivität	-Nullwert	%	
Ra	25021	24773	140	
Rb	25005	24757	140	
Rc	22935	22687	128	(Serum knapp, mit Erythrozyten verunreinigt)
Na	15080	14832	84	N Mittel = 83,25 %
Nb	14900	14652	82,5	
K1	17396	17148	97,5	K Mittel: 17710 = 100 %
K2	18520	18272	102,5	

Versuch VI

In diesem Versuch bestritten je 2 Ansätze:

Ein 300 gr. schweres die Ansätze K1_a und K1_b,
ein 280 gr. schweres die Ansätze K2_a und K2_b.

Ein erstmals geimpftes Tier (229 gr) lieferte die Ansätze N_a und N_b. Das 589 gr schwere resistente Tier, von dessen Serum wir die Ansätze R_a und R_b bereiteten, zeigte am Tage des Versuchsansatzes erheblichen Aszites, ein ungewöhnlicher Befund, da die Tumorigmpfung dieses Tieres sowie des Tieres N 5 Tage zurücklag. Auf einen Ansatz kamen je 16 Tumorexplantate vom Gesamtgewicht 30 mg. Inkubationszeit: 15 Stunden,
dann 4,5 Stunden.

Ergebnisse: (5 Min. Messung)

	Aktivität	-Nullwert	%	
K1a	21057	20825	105	
K1b	20053	19821	100,5	K Mittel (ohne K2b) = 19773,7 = 100 %
K2a	18907	18675	94,5	
K2b	17698	17466	88,5	(nur 1 ml Serum)
Ra	15059	14827	75	
Rb	14948	14716	74	R Mittel = 74,5 %
Na	8155	7923	40	
Nb	7975	7743	39	N Mittel = 39,5 %

Der Ansatz K2_b enthielt nur 1,0 ml Serum (alle anderen 1,5 ml), wurde daher in die Mittelwertberechnung von K nicht einbezogen.

Versuch VII

Ein Kontrolltier von 295 gr Gewicht lieferte die Ansätze K1_a und K1_b, ein weiteres von 287 gr den Ansatz K₂, zwei erstmals geimpfte Ratten von 250 und 279 gr Gewicht die Ansätze N₁ bzw. N₂. Die beiden letzteren wurden zusammen mit 2 resistenten Tieren 6 Tage vor dem Versuchsansatz geimpft. Die Resistenten waren 591 gr (Ansatz R₁) und 604 gr (Ansatz R₂) schwer und zeigten ebenso wie das Resistente von Versuch VI am Versuchstage erheblichen Aszites. Ein Ansatz enthielt jeweils 16 Explanate vom Gesamtgewicht 30 mg. Die Inkubationszeit betrug 14 Stunden, dann 3,5 Stunden.

Ergebnisse: (5 Min. Messung)

	Aktivität	-Nullwert	%
N1	3344	3104	33,4
N2	3168	2928	31,5
R1	8436	8196	88
R2	7993	7753	83,5
K1a	9943	9703	104
K1b	9618	9378	101
K2	9080	8840	95
K Mittel : 9307 = 100 %			

Versuch VIII

Ein 331 gr schweres Kontrolltier lieferte die Ansätze K1_a und K1_b, ein weiteres, 263 gr schweres den Ansatz K₂, zwei erstmals geimpfte Tiere von 333 und 321 gr Gewicht die Ansätze N₁ bzw. N₂. Die beiden letzteren wurden zusammen mit zwei resistenten Ratten von 292 und 307 gr Gewicht, welche die Ansätze R₁ bzw. R₂ bestritten, 4 Tage vor dem Versuchsansatz geimpft. Ein Ansatz enthielt je 16 Explantate von 30 mg Gesamtgewicht.

Inkubationszeit: 14,5 Stunden

dann 4,5 Stunden

Ergebnisse: (5 Min. Messung)

	Aktivität	~Nullwert	%	
K1a	40874	40640	99,5	
K1b	42123	41889	101	K Mittel : 41214 = 100 %
K2	41347	41113	99,5	
R1	45707	45473	110	
R2	46367	46133	112	
N1	38366	38132	92,5	
N2	36397	36163	88	

Versuch IX

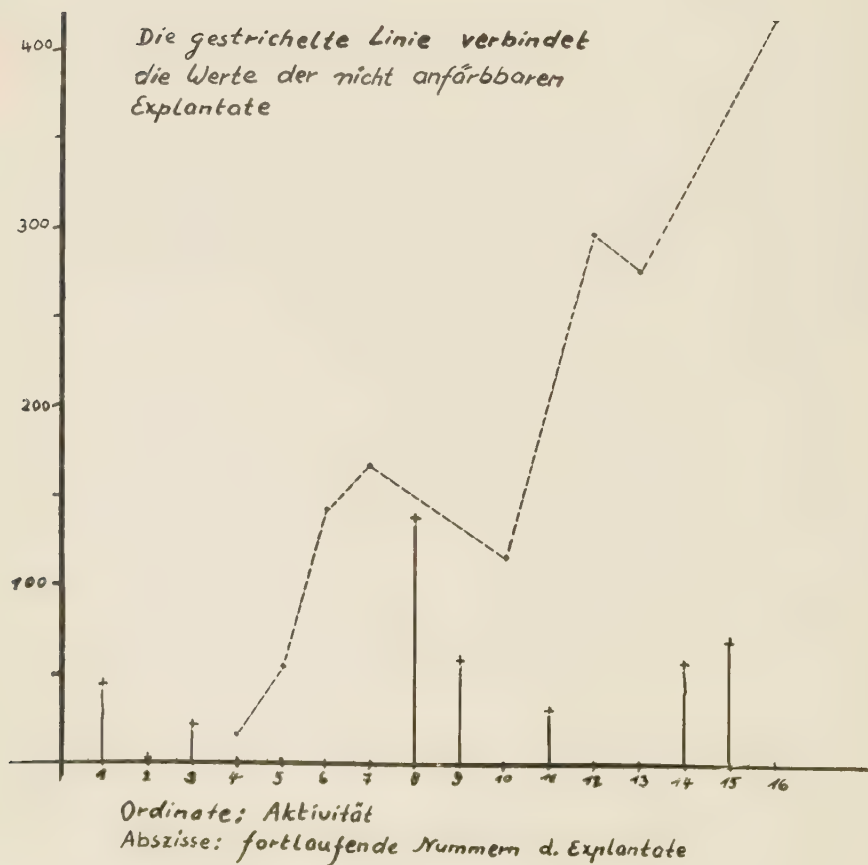
In diesem Versuch wurden aus dem Serum zweier Kontrolltiere von 206 und 227 gr Gewicht die Ansätze K_1 und K_2 bereitet, aus dem Serum eines erstmals geimpften, 306 gr schweren Tieres die Ansätze N_a und N_b , aus dem Serum eines resistenten Tieres von 386 gr Gewicht die drei Ansätze R_a , R_b und R_c . Ferner wurde ein Leeransatz (Symbol "L") mitinkubiert, welcher als Medium nur 4,5 ml HANKS'-Lösung und Penicillin in der üblichen Dosierung enthielt. Der Ansatz erhielt später den gleichen Zusatz von radioaktivem Phosphat wie alle übrigen Ansätze. Auf jeden Ansatz kamen 16 Explantate von 30 mg Gesamtgewicht. Der Inkubationsmodus in diesem Versuch unterscheidet sich von dem aller übrigen Versuche insofern, als die Explantate zunächst ohne Serumzusatz 5 Stunden vorinkubiert wurden. Hierauf erfolgte nach Serumzusatz (ausgenommen Ansatz "L") eine 16,5-stündige Weiterinkubation, dann Zugabe des aktiven Phosphats und eine dritte Inkubation von drei Stunden Dauer.

Außerdem wurde hier die Beobachtung untermauert, daß sich Explantate mit schlechter Vitalität besser mit Phenolrot anfärben als solche mit guter Vitalität:

Die Explantate des Ansatzes R_c wurden alle einzeln auf Plättchen verteilt und einzeln gemessen. Gute Anfärbbarkeit wurde mit einem "Plus", schlechte mit einem "Minus" symbolisiert. Da ein exaktes Abwägen jedes einzelnen Explantates technisch unmöglich war, wurden sie nach Augenmaß der Größe nach geordnet. Nr. 1 ist also das kleinste, Nr. 16 das größte Explantat des Ansatzes R_c .

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Färbung	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
Aktivität (5 Min.)	163	121	141	135	172	261	286	257	177	234	150	414	393	175	188	537
-Nullwert	45	3	23	17	54	143	168	139	59	116	32	296	275	57	70	419

$$R_c \text{ gesamt} = 1916$$



Da die Messung der übrigen Ansätze des Versuchs erst 24 Stunden später erfolgte, wurde der Wert "R_c gesamt" durch Abzug eines diesen 24 Stunden entsprechenden Aktivitätsverlustes den übrigen Werten angeglichen.

$${}^{32}\text{R}_{\text{c}} \text{ korrigiert} = \frac{{}^{32}\text{R}_{\text{c}} \text{ gesamt}}{14,3 \sqrt{2^t}} = \frac{1916}{14,3 \sqrt{2^1}} = 1812$$

(wobei t = Anzahl der verstrichenen Tage,
14,3 = Halbwertszeit von P³² in Tagen)

Ergebnisse: (5 Min. Messung)

	Aktivität	-Nullwert	%	
K1	1644	1172	95,5	K Mittel : 1232,5 = 100 %
K2	1865	1293	104,5	
Ra	2055	1583	129	R Mittel : 130,7
Rb	1905	1433	116	
Rc korrigiert		1812	147	
Na	2080	1608	131	+) N Mittel : 127,5 %
Nb	2002	1530	124	
L	1363	891	72,5	

+) Das Tier N hatte am Tage des Versuchsansatzes keinen Aszites. Möglicherweise handelte es sich um ein spontan Resistentes.

Versuch X

Hier und in den folgenden Versuchen wurden die Explantate nach der auf Seite 13 beschriebenen "Methode II" gewonnen. Die Ansätze sind mit arabischen Zahlen versehen;

vergleichbar ist stets nur eine ungerade mit der folgenden geraden Zahl, da dieses Zahlenpaar stets das zusammengehörige Ansatz-Paar symbolisiert.

Zwei resistente Ratten von 406 und 292 gr Gewicht bestritten die Ansätze R_1 und R_2 , zwei erstmals geimpfte Tiere von 373 und 360 gr die Ansätze N_1 bzw. N_2 . Die Impfung der genannten Ratten wurde 4 Tage vor dem Versuchsansatz vorgenommen. Zwei unbehandelte Kontrolltiere von 222 und 247 gr Gewicht bestritten die Ansätze K_1 bzw. K_2 . Der Buchstabe "L" symbolisiert zwei Leeransätze mit 3,0 ml Penicillin-HANKS-Lösung ohne Serum.

Die Inkubationszeit betrug 11 Stunden,
dann 5 Stunden.

Ergebnisse: (2 Min. Messung)

		Explantate					
		Zahl	Ges. gew.	Ser. menge	Aktivität	-Nullwert	%
1)	N2	15	12	1,5	7374	7324	64
2)	K2	15	12	1,5	11648	11589	100
3)	N1	16	24	1,5	10319	10269	100
4)	R2	16	24	1,5	16744	16694	179
5)	N1	18	29	1,5	9444	9394	76
6)	K1	18	29	1,5	12398	12348	100
7)	R1	16	36	1,5	10782	10732	120
8)	K1	16	36	1,5	8977	8927	100
9)	R2	18	32	1,5	12447	12397	122
10)	K2	18	32	1,5	10291	10241	100
11)	L	18	31	-	5612	5562	101
12)	L	18	31	-	5535	5485	100

"Proteolyt. Index":

R_1 0,078
 R_2 0,118

(Photometer-Extinction:)

N_1 0,154
 N_2 0,230

Bemerkung: Die Bezeichnung "Proteolytischer Index" wird in dieser Arbeit gebraucht für den Wert der Photometerextinction der nach dem auf den Seiten 15/16 beschriebenen Verfahren hergestellten Lösungen gegen eine Vergleichslösung. Es sei nochmals darauf hingewiesen, daß jeweils die Werte nur einer Versuchsnummer vergleichbar sind.

Versuch XI

Hier lieferten ein resistentes Tier von 362 gr Gewicht die R-Ansätze, ein erstmals zusammen mit R 5 Tage vor dem Versuchsansatz geimpftes Tier von 365 gr Gewicht einen N-Ansatz und zwei unvorbehandelte Kontrolltiere von 389 und 302 gr Gewicht die mit K_1 bzw. K_2 symbolisierten Ansätze. In den Ansätzen 7) und 8) sollte festgestellt werden, ob das Mischen der Seren von Kontrolltieren zulässig ist, was hiermit wohl positiv beantwortet ist. 9) und 10) sind Leeransätze mit 3,0 ml Penicillin-HANKS-Lösung.

Inkubationszeit: 10 Stunden

dann 5,5 Stunden

Ergebnisse: (2 Min. Messung)

		Exp.					
		Zahl	Ges. gew.	Ser. menge	Aktivität	-Nullwert	%
1)	R	16	31	1,0	10122	10072	176
2)	N	16	31	1,0	5769	5719	100
3)	R	17	37	1,0	12148	12098	134
4)	K_1	17	37	1,0	9219	9169	100
5)	R	12	27	1,0	13135	13085	125
6)	K_2	12	27	1,0	10540	1049	100
7)	K_2	13	20	1,0	10596	10546	103
8)	$K_1 + K_2$	13	20	1,0	10277	10227	100
9)	L	15	26	-	3387	3337	100
10)	L	15	26	-	3487	3437	103

R Mittel = 129,5 %

"Proteolyt. Index": (Photometer-Extinction):

R 0,029

N 0,064

K_1 0,119

K_2 0,113

Versuch XII

Ein resistentes, 337 gr schweres Tier, das 16 Tage vor dem Versuchsansatz einer provozierenden Impfung unterworfen worden war, lieferte das Serum für die Ansätze R. Zwei Kontrolltiere von 295 und 292 gr Gewicht für die Ansätze K_1 bzw. K_2 . Bei 6) handelt es sich um ein Serumgemisch beider Kontrolltiere. Auf ein erstmals geimpftes Tier N wurde verzichtet.

Inkubationszeit: 17 Stunden.

dann 4 Stunden.

Ergebnisse: (2 Min. Messung)

		Expl.		Min.			
		Zahl	Ges gew.	Ser. menge	Aktivität	Nullwert	%
1)	R	18	23	1,0	2196	2133	143
2)	K1	18	23	1,0	1548	1485	100
3)	R	16	22	1,0	1656	1593	123
4)	K2	16	22	1,0	1362	1299	100
5)	R	15	19	1,2	1644	1581	129
6)	K1 + K2	15	19,5	1,2	1284	1221	100

R Mittel = 131.7

"Proteolyt. Index":

Photometer-Extinction: (je 2 Ansätze)

R 0,14 (0,135)

K_1 0,57 (0,57)

K_2 0,254 (0,245)

Versuch XIII

Dieser Versuch zeichnet sich durch die Besonderheit aus, daß die zwei verwendeten, 270 und 475 gr schweren Tiere schon eine Parabiiose überstanden hatten. Sie lieferten die Ansätze R₁ bzw. R₂. Sie erhielten ihre provozierende Impfung zusammen mit einem 242 gr schweren, erstmals zu impfenden Tier (Ansatz N) 4 Tage vor dem Versuchsansatz. Außerdem wurde noch das Serum desjenigen Tieres verwendet, das den soliden Tumor für die Explantation lieferte: Ansatz T. Erstmals in diesem Versuch wurden alle Ansätze mit einem Serumgemisch aus drei Kontrolltieren von 209, 225 und 224 gr Gewicht beschickt.

Inkubationszeit: 15 Stunden

dann 2 Stunden

Ergebnisse: (2 Min. Messung)

		Expl.					
		Zahl	Ges. gew.	Ser. menge	Aktivität	=Nullwert	%
1)	K	17	18	1,3	2150	2087	100
2)	R2	17	18	1,3	3078	3015	145+)
3)	K	14	16	1,3	1605	1542	100
4)	R1	14	16	1,3	2282	2219	145
5)	K	14	22	1,3	1848	1785	100
6)	R2	14	22	1,3	2317	2254	126+)
7)	K	14	23	1,0	4856	4793	100
8)	N	14	23	1,0	4617	4554	96
9)	K	19	32	0,5	2156	2093	100
10)	T	19	32	0,5	984	921	44
11)	R1	16	22	1,0	2315	2252	105
12)	R2	16	22,5	1,0	2209	2146	100
13)	R2	15	24	0,8	3686	3623	129+)
14)	K	15	24,5	0,8	2858	2795	100

+) R₂ Mittel = 133,3

"Proteolyt. Index"

K₁ 0,235)
 K₂ 0,190)
 K₃ 0,198)
 K₄ 0,208)
 K Mittel = 0,2078

(Photometer-Extinction:)

R₁ 0,105)
 R₂ 0,11)
 N 0,05
 T 0,337
 R Mittel = 0,1075

Versuch XIV

Hier lieferte ein 250 gr schweres, 2 Tage vor dem Versuchsansatz geimpftes resistentes Tier die Ansätze R. Die Ansätze K enthielten ein Gemisch der Seren zweier Kontrolltiere von 236 und 212 gr Gewicht. Die Ansätze 5) mit 8) dienten der Überprüfung der Zuverlässigkeit der Methodik; 7) und 8) waren mit Kälberserum (KS) beschickt.

Inkubationszeit: 15 Stunden,

dann 2 Stunden.

Ergebnisse: (5 Min. Messung)

Expl.						
	Zahl	Ges. gew.	Ser. menge	Aktivität	-Nullwert	%
1) K	18	13	1,2	2533	2378	100
2) R	18*	13	1,2	3018	2863	120
3) K	16	14	1,4	2221	2066	100
4) R	16	14	1,4	3539	3384	164
5) K	20	13	0,8	3112	2957	106
6) K	20	13	0,8	2960	2805	100
7) KS	19	14	1,5	1658	1503	100
8) KS	19	14	1,5	1713	1558	104

R Mittel = 142 %

"Proteolyt. Index":

(Photometer=Extinction:)

K₁ 0,4

R 0,18

K₂ 0,275 K Mittel = 0,317

K₃ 0,275

Versuch XV

Hier wurden zwei resistente, 375 und 327 gr schwere Tiere für die Ansätze R_1 und R_2 verwendet, die schon je zwei Parabiosen überstanden hatten. Für den Ansatz R_3 wurde außerdem ein weiteres resistentes Tier von 395 gr Gewicht verwendet, das keine Parabiose hinter sich hatte. Die Impfung der drei genannten Tiere fand vier Tage vor dem Versuchsansatz statt. Das Mischserum für die K-Ansätze lieferten zwei Kontrolltiere von 217 und 228 gr Gewicht. Ein weiteres unbehandeltes Kontrolltier wurde zur Entblutung nicht, wie üblich, mit Äther narkotisiert, sondern vorher durch Genickschlag getötet (Ansatz K_G).

Bei dem Ansatzpaar 1) und 2) geht es also um den Wirkungsvergleich des ätherfreien mit dem ätherhaltigen Serums. Bei den Ansätzen 9) mit 12) handelt es sich um Testansätze mit Kälberserum (= KS).

Inkubationszeit: 12 Stunden,

dann 2 Stunden.

Ergebnisse: (5 Min. Messung)

		Expl.				
		Zahl	Ges. gew.	Ser. menge	Aktivität	-Nullwert
1)	KG	20	14	0,75	2875	2709
2)	K	20	14	0,75	3426	3260
3)	K	16	16	1,5	3097	2931
4)	R1	16	16	1,5	3747	3581
5)	K	15	14	1,5	2223	2057
6)	R2	15	14	1,5	2940	2774
7)	K	17	15	1,5	2291	2125
8)	R3	17	15	1,5	2662	2496
9)	KS	17	18	1,5	2037	1871
10)	KS	17	18	1,5	1995	1829
11)	KS	15	12	2,5	1653	1487
12)	KS	15	12	2,5	1538	1362

Versuch XVI

Zwei resistente Ratten von 432 und 277 gr Gewicht bestritten in diesem Versuch die Ansätze R_1 und R_2 . Ihre provozierende Impfung lag 4 Tage vor dem Versuchsansatz. Das K-Mischserum wurde aus dem Blut von drei Kontrolltieren von 210, 205 und 208 gr Gewicht gewonnen. Die Ansätze 3), 4), 9) und 10) enthielten Kälberserum; bei 9) und 10) handelt es sich um gewöhnliche Testansätze zur Überprüfung der Methodik.

Das Ansatzpaar 3) / 4) diente der Aufklärung der Frage, ob die Anwesenheit von Bakterien in einem Ansatz ein Versuchsergebnis wesentlich verfälschen kann: KS_s wurde mit üblichen sterilen Kautelen bereitet, KS_u dagegen absichtlich unsteril gemacht.

Inkubationszeit: 12 Stunden,
dann 2,5 Stunden.

Ergebnisse: (5 Min. Messung)

		Expl.		Ser. menge ml	Aktivität	=Nullwert	%
	Zahl	Ges. gew.					
1) R_1	19	13 mg		1,5	4919	4753	115
2) K	19	13		1,5	4296	4130	100
3) KS_u	17	14		1,5	2087	1921	81,5
4) KS_s	17	14		1,5	2524	2358	100
5) R_2	18	18		1,5	7986	7820	136
6) K	18	18		1,5	5895	5729	100
7) R_1	20	18		1,0	3726	3560	112
8) K	20	18		1,0	3336	3170	100
9) KS	17	18		1,5	2533	2367	103
10) KS	17	18		1,5	2473	2307	100

R_1 Mittel = 113,5 %

Versuch XVII

Ein 489 gr schweres, resistentes Tier bestritt hier drei R-Ansätze. Die provokatorische Impfung lag fünf Tage vor dem Versuchsansatz. Die K-Ansätze enthielten das Serum eines 370 gr schweren Kontrolltieres. In diesem Versuch sollte die Dosisabhängigkeit des stoffwechselsteigernden Effekts der Seren resistenter Tiere untersucht werden, d.h. die Frage, ob der Effekt mit vermehrter Serumzugabe steigt oder nicht.

Inkubationszeit: 13 Stunden,

dann 2,5 Stunden.

Ergebnisse: (5 Min. Messung)

Expl.							
	Zahl	Ges. gew.	Ser. menge	Aktivität 5 Min.	=Nullwert	%	
1) R	19	13	1,7	4172	4006	147	
2) K	19	13	1,7	2914	2748	100	
3) R	18	14	1,0	5056	4890	143	
4) K	18	14	1,0	3588	3422	100	
5) R	18	18	0,5	4814	4648	126	
6) K	18	18	0,5	3830	3664	100	

R Mittel = 138,7 %

"Proteolyt. Index":

R 0,215

K 0,45

ERGEBNISSE UND BESPRECHUNG

Blutserum tumorresistenter Ratten (R) fördert als Mediumzusatz in Gewebekultur nach einer 4-16 Tage zurückliegenden provokatorischen Impfung mit Tumormaterial regelmäßig die Aufnahme von aktivem Phosphat in Tumorexplantate der gleichen Linie. Der Vergleich mit der Wirkung von Serum unvorbehandelter Kontrolltiere (K) unter gleichen Bedingungen zeigte bei der Verwendung des Serums resistenter Tiere eine um 10 bis 79 % höhere Radioaktivität (Mittelwert 31.8 %, Standartabweichung $\pm$ 13.3 %). Die Signifikanz (t-Test nach STUDENT) berechneten wir wegen der verschiedenartigen Methodik in den Versuchsgruppen I mit IX und X mit XVII getrennt. In beiden Gruppen war $P < 0,0005$. Die Wirkung der Seren resistenter Tiere 2 bis 3 Tage nach der provokatorischen Impfung war unregelmäßig. Seren unvorbehandelter Tiere, welche zusammen mit den resistenten Tieren zum gleichen Zeitpunkt einer provokatorischen Impfung mit gleichem Material unterzogen worden waren (Gruppe N), wirkten in der Regel depressiv auf die Tumorexplantate. Die Seren nur zweier Tiere regten die Phosphataufnahme an. Die Erklärung für dieses abweichende Verhalten liegt wohl in der spontanen Tumorresistenz dieser Tiere. Da es keinen Test auf Nicht-Resistenz gibt, den die Versuchstiere überleben, und damit auch keine Möglichkeit, resistente und nichtresistente Tiere in dieser Gruppe zu trennen, war das Auftreten derartiger Ausnahmen zu erwarten.

Aber auch in der Tiergruppe R, wo die Tumorresistenz durch mehrfache Testimpfung anscheinend gesichert worden war, gab es 4 Tiere mit abweichendem Verhalten, die jedoch schon makroskopisch auffallende Anomalien zeigten: Eine Ratte hatte einen riesigen, die gesamte linke Brusthöhle ausfüllenden, das Mediastinum stark nach rechts verdrängenden Lungenabszeß mit einer derben Kapsel. Die übrigen 3 Tiere zeigten am Tage des Versuchsansatzes einen erheblichen Tumoraszites. Auffallenderweise handelte es sich hier um durchwegs ältere, etwa 600 Gramm schwere Tiere. Die Seren dieser Ratten wirkten depressiv. Eine solche offensichtliche Wandlung der Resistenzeigenschaft ist nicht neu (5) (Die genannten 4 Tiere wurden bei der Berechnung der Signifikanz nicht berücksichtigt.) Die Reaktionslage eines Organismus zur Zeit der Tumorüberimpfung spielt sicher eine Rolle bei der Überwindung einer Infektion mit Tumoraszites. Aus einer Schwächung der Abwehrkraft, im ersten Falle durch die Auseinandersetzung mit der eitrigen Infektion, in den anderen Fällen wohl durch Alterung bedingt, resultiert der Verlust einer früher nachgewiesenen Tumorresistenz.

Die genannten Schwierigkeiten sind gute Beispiele dafür, welche Fehlerquellen beim Arbeiten mit biologischem Material auftreten können. Fehlerquellen, die kaum ausmerzbar sind. Trotzdem ist es hier (unseres Wissens erstmalig) gelungen

gen, überhaupt ein biologisches Äquivalent für das interessante Phänomen der Tumoresistenz zu finden, und zwar in Gestalt einer bei der verwendeten Versuchsmethodik konstanten Eigenschaft des Serums resistenter Tiere, den Stoffwechsel von Tumorexplantaten signifikant zu beeinflussen

Bei den unter den Nebenuntersuchungen durchgeführten Serumelektrophoresen (Es wurden dabei jeweils die gleichen Seren verwendet wie für die Explantationsversuche) waren keine signifikanten Unterschiede zwischen resistenten und nicht resistenten Ratten festzustellen. Die Hoffnung, hier im Verhalten der Eiweißfraktionen eine Erklärung für die Ergebnisse der Explantationsversuche zu finden, hat sich nicht erfüllt.

So eindeutig die Erhöhung der Phosphataufnahme der Tumorexplantate unter der Wirkung des Serums resistenter Tiere war, so schwierig ist dieses Ergebnis zu deuten. Der Sinn von Versuchen mit der Explantationstechnik unter Verwendung radioaktiv markierter Substanzen ist der, in der Aufnahme, im Umsatz und im Einbau dieser Substanzen ein Maß für die Syntheseleistung des explantierten Gewebes zu gewinnen und damit indirekt auch auf dessen Vitalität zu schließen (13 mit 18). Der Vorteil der Verwendung von radioaktivem Phosphat liegt einerseits in der Preisgünstigkeit dieser Substanz, vor allem aber in der Tatsache, daß die Phosphorylierung eine der allgemeinsten biochemischen Reaktionen überhaupt darstellt. Entsprechend allgemein ist freilich auch der Aussagewert der P^{32} -Methode. Man kann z.B. bei der Verwendung der DNS-spezifischen Kernbaustoff Thymidin mit einiger Sicherheit sagen, daß die Einbaurate dieses Stoffs in lebendes Gewebe dessen Mitoserate direkt proportional ist. Eine derartig spezielle Aussage ist bei Verwendung von aktivem Phosphat nicht möglich. Man kann also aus der Einbaurate des Phosphats nicht auf die Intensität bestimmter Spezialfunktionen des intermediären Stoffwechsels schließen, sondern höchstens auf eine allgemeine Tendenz. So darf man z.B. annehmen, daß die allgemeine Stoffwechselintensität in einem direkten Verhältnis zur gemessenen Phosphataufnahme steht. Wichtig ist dabei auch die Frage des Verhältnisses von physikalisch gelöstem zu chem. gebundenem Phosphat innerhalb des Explantats. Sie ist inzwischen dahingehend beantwortet worden, daß die beiden Phasen physikalische Lösung / chemische Bindung in einer weitgehend konstanten Relation zueinander stehen (17). Man kann also voraussetzen, daß der Einbau aktiven Phosphates in hochmolekulare Substanzen des Explantates und entsprechend auch die Steigerung oder Hemmung dieses Vorganges der mit unserer Methode gemessenen P^{32} -Gesamtaufnahme proportional ist. Es besteht also nach dem Gesagten ein direktes Verhältnis zwischen

- 1) der gemessenen Radioaktivität
- 2) der Gesamtaufnahme von aktivem Phosphat
- 3) dem Einbau von Phosphat in die hochmolekularen Substanzen
- 4) der allgemeinen Stoffwechselaktivität der Explantate.

Sehr zurückhaltend muß man die Frage beantworten, ob man von der Höhe der gemessenen Radioaktivität auf die Vitalität der betreffenden Explantate schließen darf. Der sich dem unbefangenen Betrachter anbietende Schluß, ein erhöhter Phosphateinbau spreche in jedem Fall für eine erhöhte Vitalität des explantierten Gewebes, ist durch die Untersuchungen von BOQUOI (19) widerlegt. Der genannte Autor behandelte Leberexplantate mit verschiedenen Zytostatika von alkylierenden Typ und stellte dabei nach einer gewissen Einwirkungszeit ausnahmslos eine signifikante Erhöhung der Aufnahme von markiertem Phosphat durch die Explantate fest. Dieser Befund stellt eine Parallele zu den in vorliegender Arbeit gewonnenen Ergebnissen dar. Ein ähnlicher Effekt läßt sich durch Bestrahlung darstellen: Die Zellpermeabilität für Phosphat-Ionen ist 24 Stunden nach der Behandlung mit ionisierenden Strahlen (ebenso wie die Adenosintriphosphat-Aktivität) erhöht. Nach POPPER und SCHAFFER (20) ist dieser Effekt durch die Eigenschaft ionisierender Strahlen bedingt, Sulfohydryl-Gruppen zu oxydieren. Diese SH-Gruppen stellen nach HOLZER (21) unter anderem auch einen Angriffspunkt der alkylierenden Zytostatica dar. +) (Vergleiche auch die Bezeichnung "Radiomimetica" für diese Substanzgruppe!). Es liegt nach diesen Überlegungen nahe, einen ähnlichen Wirkungsmechanismus als Ursache für die erhöhte Phosphataufnahme der Tumorexplantate unter der Wirkung des Serums resistenter Ratten anzunehmen. Die Tiere würden nach dieser Hypothese einen Faktor bilden, der die SH-Gruppen von Fermenten des Tumors angreift und damit die Permeabilität der explantierten Tumorzellen für Phosphat erhöht. Die dazu parallel gehende Aktivitätserhöhung des Adenosintriphosphats spricht wiederum für eine Anregung der oxydativen Phosphorylierung, somit also der Zellatmung. Man kann also sagen, daß sich die Tumorzellen unter dem Einfluß der ionisierenden Strahlen, der Radiomimetica oder des hypothetischen, von den resistenten Tieren gebildeten, gegen den Tumor gerichteten Faktors "zu Tode atmen".

Eine andere Erklärungsmöglichkeit liegt in der Annahme einer Erschöpfungsphase des Organismus des resistenten Tieres an Stoffen oder Faktoren, die unter Umständen in den Tagen zwischen provokatorischer Impfung und Versuchsansatz eine Rolle bei der Überwindung der Tumorinfektion und bei der Zersetzung und Resorption der verimpften Carzinomzellen spielten. So zeigte ein zu mehreren Versuchen durchgeführter Vergleich der "Proteolytischen Indices" nach GASCHLER der Seren der unbehandelten Kontrolltiere (K) und der Seren resistenter Tiere (R) bei letzteren eine Verarmung an Proteasen, welche stets

+) Andere Wirkungsmechanismen der alkylierenden Zytostatica, die hier allerdings nicht unmittelbar interessieren, sind:

Blockade der Phosphatgruppen der Desoxyribonukleinsäuren (22) und Hemmung der DPN-(= NAD) -Biosynthese (21).

mit der stoffwechselsteigernden Wirkung auf Tumorexplantate parallel ging. Demnach läge die Ursache dieser Wirkung nicht im Vorhandensein eines den Stoffwechsel anregenden Faktors, sondern im Fehlen eines Faktors, der das Wachstum normalerweise hemmt. DYBALLA fand bei der Untersuchung von 132 Patienten mit klinisch manifesten Malignomen im Hals-Nasen-Ohren-Bereich ausnahmslos Werte des "Proteolytischen Index", die gegenüber denen klinisch gesunder Menschen signifikant erniedrigt waren (12). Dieser Befund läßt sich mit dem hier gewonnenen Ergebnis zwanglos in Übereinstimmung bringen, wenn man für die Gruppen "provokatorisch geimpfte tumorresistente Ratten" und "menschliche Träger von manifesten Malignomen" jeweils ein Erschöpfungsstadium an Proteasen annimmt. Ein solches wäre bei den Resistenten als Residuum der Überwindung einer akuten Infektion mit Tumorzellen zu werten, bei den menschlichen Patienten als Folge monate- bis jahrzehntelanger vergeblicher Auseinandersetzung des Organismus mit carzinogenen Schädlichkeiten, praecancerösen Zuständen und Nestern von entarteten Zellen (Vergl. "Carcinoma in situ").

ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Arbeit war es, eine biologische Wirkung des Serums von Ratten nachzuweisen, bei welchen mehrere Tumortransplantationen erfolglos geblieben waren (sog. tumorresistente Tiere). Im vergleichenden Ansatz wurde dabei Blutserum von normalen und von tumorresistenten Tieren in seiner Wirkung als Mediumzusatz auf explantierte Tumoren untersucht. Es war damit möglich, eine Art von Test für die Resistenz eines Tieres zu entwickeln. Voraussetzung war dabei, daß den resistenten Tieren einige Tage vor dem Versuchsansatz nochmals eine bestimmte Menge von Tumorzellen appliziert wurde. Dem Medium nach einer gewissen Inkubationsdauer zur anschließenden kurzen Weiterinkubation zugesetztes radioaktives Phosphat wurde im Falle der Verwendung von Serum resistenter Tiere in signifikant gesteigertem Maße in die Explantate eingebaut. Im Serum tumorresistenter Ratten findet sich offenbar ein Faktor, der die Phosphorylierungsprozesse im Tumorexplantat anregt. Es wird diskutiert, ob es sich dabei um einen gegen den Tumor gerichteten Faktor handelt oder um einen verminderten Gehalt an proteolytischen Fermenten, welcher eine Stoffwechselenthemmung bewirkt. Zur Stützung ersterer Hypothese werden die Ergebnisse einiger Autoren herangezogen, welche die Wirkung ionisierender Strahlen und radiomimetischer Substanzen auf den Stoffwechsel untersuchten, zur Stützung der zweiten die Ergebnisse der parallel zu einigen Versuchen durchgeführten Bestimmung der Proteasen des Bluts.

Herrn Prof. Dr. W. BÜNGELER danke ich für die Überlassung der Arbeit, Herrn Prof. Dr. Dr. H. WRBA für die Einweisung in die Technik der Gewebekultur und die Überwachung der Arbeit. Ferner bin ich zu Dank verpflichtet Herrn Dr. H. RABES für viele praktische Tips und wertvolle Ratschläge, desgleichen Herrn Dr. BAYERLE. Danken möchte ich nicht zuletzt auch den Herrn Dr. G. LOY und P. HOLZER für ihre Assistenz.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) WRBA, H. und RABES, H. : Zur natürlichen Resistenz gegen Impftumoren.
Z. Krebsf. 65, 17 (1962).
- 2) WRBA, H. : Die Erzeugung einer Immunität gegen Impftumoren bei der Ratte durch einen bestimmten Stamm des Walker-Carzinoms in Aszitesform.
Verh. dtsh. Ges. Path. 43, 354 (1959).
- 3) EHRLICH, P. : Experimentelle Carzinomstudien an Mäusen.
Arb. kgl. Inst. Frankf. /M. 1, 77 (1906).
- 4) LETTRE, H. : Eigenschaftsänderungen von Tumorzellen.
Z. Krebsf. 59, 568 (1953).
- 5) WRBA, H. und RABES, H. : Spontane und induzierte Wandlungen in Biologie und Wachstum von Geschwülsten.
Z. Krebsf. 65, 316 (1963).
- 6) FURTH, O. B., BARNES, W. A. and BROWER, A. B. : Studies of resistance to transmissible leukemia in mice by means of parabiosis.
Arch. Path. 29, 163 (1940).
- 7) CLOUDMAN, A. M. : Reactions of hybrid and parabiotic pseudo-hybrid mice to inoculations of tumor C 198.
Cancer Res. 3, 47 (1943).
- 8) BICHERL, J. and HOLM-JENSEN, I. : Parabiosis and resistance to transplantation; studies on resistance to transmissible leukemia in mice by means of heterogenetic and homo-genetic parabiosis.
Acta. path. microbiol. scand. 26, 319 (1949).
- 9) RABES, H. : Untersuchungen über humorale Abwehrreaktionen gegen Impftumoren an Parabioseratten.
Z. Krebsf. 64, 191 (1961).

- 10) WRBA, H. und RABES, H.: Zur Frage der Tumorresistenzübertragung im Parabioseversuch.
Z. Krebsf. 63, 215 (1960).
- 11) GASCHLER, A.: Die parenterale Fermenttherapie maligner Tumoren und chronischer Entzündungsprozesse.
Haug, Ulm (1961).
- 12) DYBALIA, R.: Die Bestimmung des proteolytischen Potentials des Blutes nach Gaschler und ihr Wert als Carzinomdiagnosticum.
Dtsch. Med. J. 9, 298 (1960).
- 13) WRBA, H. und RABES, H.: Das Fortbestehen in vivo ausgelöster Wachstumsvorgänge an explantierten Organen.
Naturwissensch. 48, 648 (1961).
- 14) ---, --- Zur Methode der quantitativen Bestimmung des Umsatzes an markierten Stoffen durch Organkulturen.
Exp. Cell. Res. 26, 62 (1962).
- 15) ---, --- Der Umsatz radioaktiv markierter Verbindungen als Maßstab für die Stoffwechselintensität explantierter Organe.
Naturwissensch. 49, 282 (1962).
- 16) ---, --- und GEIPEL, A.: Zur Bestimmung der Vitalität von Organ- und Tumorkulturen durch den Einbau von markiertem Adenin.
Z. ges. exp. Med. 134, 300 (1961).
- 17) WRBA, H. und RABES, H.: Zur Frage der Beziehungen zwischen Vitalität von Explantaten und Verwertung radioaktiver Verbindungen.
Klin. Wochenschr. 40, 1006 (1962).
- 18) WRBA, H.: Vitalitätsbestimmung durch Aufnahme und Umsatz markierter Verbindungen.
Z. Zellf. 53, 90 (1960).
- 19) BOQUOI, E.: Der Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat als Anzeige für die Stoffwechsellaage der Leber.
Atompraxis 10, 1 (1964).

20) POPPER, H. und SCHAFER, E.:

Die Leber.

Thieme, Stuttgart (1961).

21) DOLD, U., MIELSCH, M. und HOLZER, H.:

DPN-Gehalt, Nukleinsäure-Gehalt und Zellstruktur von Aszitestumorzellen nach Einwirkung alkylierender Zytostatica.

Z. Krebsf. 65, 139 (1962).

22) KUSCHINSKY, G. und LÜLLMANN, H.:

Lehrbuch der Pharmakologie.

Thieme, Stuttgart (1964).

LEBENS LAUF

Am 30. 10. 1939 wurde ich in München als Sohn des Zahnarztes Dr. Georg Rothdach und dessen Ehefrau Caroline, geb. Hirschmann, geboren. Nach dem Besuch der Volksschule trat ich 1950 in das Humanistische Theresiengymnasium in München ein, wo ich 1959 das Abitur machte. Im gleichen Jahr begann ich mein 11-semestriges Medizinstudium an der Münchener Universität, legte hier 1960 mein Vorphysikum und 1962 mein Physikum ab. Die ersten beiden klinischen Semester war ich als Demonstrator im Physiologischen Institut in München tätig und begann Ende des darauf folgenden Semesters mit vorliegender Dissertationsarbeit. 1965 beschloß ich mein Studium mit der ärztlichen Prüfung.

